

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

Lokalisation und Eigenschaften von saurer Phosphatase in BCG-induzierten Alveolar-Makrophagen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Roland Bernhard Gross
aus Stuttgart

1976

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

Lokalisation und Eigenschaften von saurer Phosphatase in BCG-induzierten Alveolar-Makrophagen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Roland Bernhard Gross
aus Stuttgart

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

Korreferent: Prof. Dr. med. D. Neubert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19. Januar 1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. EXPERIMENTELLER TEIL	4
2.1 Material und Methoden	4
2.1.1 Gewinnung von Alveolarmakrophagen	4
2.1.2 Präparation der Zellpopulationen	5
2.1.3 Gewinnung von Zellfraktionen durch Differentialzentrifugation	5
2.1.4 Proteinbestimmung	6
2.1.4.1 Erstellung der Eichkurve	7
2.1.4.2 Durchführung der Proteinbestimmung	9
2.1.5 Bestimmung der Enzymaktivität	10
2.1.5.1 Erstellung der Phosphat-Eichkurve	10
2.1.5.2 Durchführung der Aktivitätsbestimmung	11
2.1.6 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert der Inkubationslösung	15
2.1.7 Untersuchung des Einflusses von Tartrat, Cu^{++} , Molybdat, Citrat und PCMB auf die Enzymaktivität	15
2.18. Elektrophoretische Trennung der Saure- Phosphatase-Isoenzyme auf Polyacrylamid- Gel	18

	Seite
2.1.8.1 Vorbereitung der Proben	18
2.1.8.2 Herstellung des Polyacrylamid-Gels und Durchführung der Elektrophorese	19
2.1.8.3 Färbemethode der SP-Bänder auf den Gelsäulen	19
2.1.9 Elektrophoretische Trennung und Nachweis von β -Glucuronidase in den einzelnen Zellfraktionen	20
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	21
3.1 Ausarbeitung der Bestimmung der SP- Aktivität in BCG-induzierten Alveolar- Makrophagen	21
3.1.1 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration	21
3.1.2 Abhängigkeit der enzymatischen Spal- tung von β -Glycerophosphat von der Inkubationszeit	23
3.1.3 Prüfung der Abhängigkeit der enzyma- tischen Spaltung von β -Glycerophosphat von der Enzymkonzentration	23
3.1.4 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert des Inkubationsmediums	26

	Seite	
3.2	Bestimmung der SP-Aktivität und die intrazelluläre Verteilung des Enzyms in BCG-induzierten Alveolar-Makrophagen	28
3.3	Untersuchung des Einflusses von Tartrat, Cu^{++} , Molybdat, PCMB und Citrat auf die SP-Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen	33
3.4	Elektrophoretische Auftrennung der SP-Isoenzyme in den einzelnen Zellfraktionen auf Polyacrylamid-Gel	40
4.	ZUSAMMENFASSUNG	44
5.	LITERATURVERZEICHNIS	46



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0006

1. EINLEITUNG

Saure Phosphatasen - katalisierende Enzyme, die im sauren pH-Bereich eine Spaltung von Phosphorsäureestern bewirken - kommen in fast allen Geweben vor, wenn auch in recht unterschiedlichen Konzentrationen (1).

COHN und HIRSCH (2,3) zeigten, daß die saure Phosphatase während der Phagozytose aus Lysosomen freigesetzt wird und im Cytoplasma von Makrophagen nachweisbar ist. COHN und WIENER (4, 5) untersuchten vor und nach Phagozytoseversuchen im durch Differentialzentrifugation gewonnenen 15.000xg-Rückstand und 15.000xg-Überstand die Aktivität lysosomaler Enzyme in Peritoneal- und Alveolar-Makrophagen (6, 7, 8)

Merkwürdigerweise befanden sich unter diesen Versuchsbedingungen schon vor der Phagozytose beträchtliche SP-Aktivitäten im 15.000xg-Überstand. Die im 15.000xg-Überstand vor den Phagozytose-Versuchen nachgewiesenen lysosomalen Enzymaktivitäten wurden mit mechanischen oder osmotischen Schädigungen von Lysosomen während der Gewinnung der Zellfraktionen in Zusammenhang gebracht.

Unter den von den Autoren angewandten Bedingungen mußte sich jedoch im 15.000xg-Überstand auch der überwiegende Teil des endoplasmatischen Retikulums befinden. FISHMAN und Mitarb. (9) beschrieben, daß elektronenoptisch β -Glucuronidase, ebenfalls ein lysosomales Leitenzym, nicht nur in Lysosomen, sondern auch im endoplasmatischen Retikulum nachweisbar ist. Aus diesem Grunde erhob sich die Frage, ob

saure Phosphatase in Makrophagen nicht auch mikrosomal lokalisiert vorkommt.

Um diese Frage zu prüfen, ist die vorliegende Arbeit durchgeführt worden.

AUFGABENSTELLUNG:

Es wurde zur Aufgabe gestellt, die intrazelluläre Verteilung der SP-Aktivität in Alveolarmakrophagen von Kaninchen zu untersuchen. Weiterhin sollte versucht werden, die SP-Aktivität in den einzelnen subzellulären Fraktionen näher zu charakterisieren.

Um adäquates und ausreichendes Untersuchungsmaterial zu erhalten, wurden aus zwei Gründen Bazille-Calmette-Guérin-induzierte Alveolarmakrophagen gewählt:

1. Alveolarmakrophagen enthalten fast 15 mal mehr SP-Aktivität als Peritonealmakrophagen (4).
2. Durch die Induktion mit Bazille-Calmette-Guérin (BCG) lassen sich 60 - 100 mal mehr Makrophagen aus den Lungenalveolen von Kaninchen gewinnen (10, 11).

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Gewinnung von BCG-induzierten Alveolar-Makrophagen

2-3 kg schwere Neuseeländer-Kaninchen erhielten in Anlehnung an MYRVIK und Mitarb. (10, 11) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen intravenös je 30 mg BCG-Keime (Behringwerke Marburg), die in 2 ml physiol. Kochsalzlösung suspendiert wurden.

5 Wochen nach BCG-Applikation wurden die Tiere durch Injektion von 20 cm³ Luft in die Ohrvene getötet. Die freipräparierte Trachea wurde durch eine mit PVC-Schläuchen geschützte Klemme abgeklemmt, kranial durchtrennt und das Herz-Lungen-Präparat isoliert.

Durch eine zwischen die Klemme in die Trachea eingeführte Knopfkanüle wurden die Lungen mit physiol. Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,01 % Heparin (Liquemin der Firma La Roche) ausgespült und die so erhaltene Zellsuspension durch ein feines Stahlsieb geschickt, um Zellklumpen und Trachealschleim abzutrennen.

Nachdem die Zellen durch Zentrifugation (5 Min. bei 240xg) gesammelt und ad 10 ml mit heparinisierte NaCl-Lösung (s.o.) aufgefüllt und resuspendiert worden waren, erfolgte die Zellzählung in einer Schilling-Zählkammer sowie die Zelldifferenzierung durch ein nach PAPPENHEIM gefärbtes Ausstrich-Präparat.

Die Gesamtzellausbeute schwankte bei 10 Tieren zwischen $4 - 6 \times 10^8$ Zellen. Das Zellmaterial setzte sich zusammen aus 85 - 90 % großer Makrophagen, 5 - 7 % Lymphocyten und der Rest aus polymorphkernigen Leukozyten.

2.1.2 Präparation der Zellpopulationen

Die dreifach in 0,25 m Saccharose gewaschenen Zellen wurden durch nochmalige Zentrifugation (5 Min. bei 240xg) und Verwerfen des Überstandes in 5 ml eiskühlter 0,25 m Saccharose resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Potter-Homogenisator unter Eiskühlung bei 5.000 U/min. 3 x 2 Min. lang homogenisiert, wobei zwischen den einzelnen Homogenisationsphasen Pausen von 4 Min. eingelegt wurden, um unerwünschte Wärmeentwicklung zu vermeiden. Zwischen jeder Homogenisationsphase wurde das Zellmaterial unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

2.1.3 Gewinnung von Zellfraktionen durch Differentialzentrifugation

Ein Aliquot des Zellhomogenats wurde zunächst 5 min. lang bei 240xg und 4°C . zentrifugiert. Der Rückstand repräsentierte die Kernfraktion (R_1), welche nach phasenkontrastmikroskopischer Kontrolle in 3 ml eiskühlter 0,25 m Saccharose resuspendiert und eingefroren wurde.

Der 240xg-Überstand wurde 20 min. bei 0°C. und 15.000xg zentrifugiert. Der 15.000xg-Rückstand (R_2) - die lysosomal-mitochondriale Fraktion - wurde mit 0,25 M kalter Saccharose ad 10 ml aufgefüllt, resuspendiert und eingefroren. Der 15.000xg-Überstand wurde 60 min. bei 10⁵xg zentrifugiert. Der dabei anfallende Rückstand repräsentierte die mikrosomale Fraktion (R_3). Der 10⁵xg-Überstand stellt die partikelfreie zytoplasmatische Fraktion (U_3) dar.

Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen kontrolliert. ¹⁾

Vor der Enzymaktivitätsbestimmung sind die einzelnen Fraktionen 5 mal durch Einfrieren (Trockeneis-Aceton-Gemisch) und Auftauen vorbehandelt worden.

2.1.4 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in den einzelnen Zellfraktionen wurde mit der Methode nach WEICHSELBAUM (12) in der Modifikation nach MEDZIHRADSKY (13) durchgeführt.

1) Für diese Untersuchungen bin ich Herrn Dr. v. Keiyslerling vom II. Anatom. Institut der FU Berlin zu Dank verpflichtet.

2.1.4.1 Eichkurve (siehe Abb. 1)

Die Aufstellung der Eichkurve erfolgte unter Verwendung von Rinder-Serumalbumin (Behringwerke Marburg) in einem Konzentrationsbereich von 25 - 200 mg/ml. 0,1 ml der jeweils entsprechenden Konzentration wurde eingesetzt und nach der bei 2.1.4.2 geschilderten Methode die Proteinbestimmung durchgeführt.

Wie aus der Eichkurve ersichtlich, entsprechen 100 mg Protein/ml einer Extinktionszunahme von 0,250 unter diesen Bedingungen.

Der Umrechnungsfaktor F zur Berechnung der Proteinkonzentration in mg/ml (die nur bei der Erstellung der Eichkurve bekannt ist) aus der Extinktionsveränderung ΔE unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge der Proteinlösung in ml beträgt:

$$\text{Proteinkonz.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \times \text{Menge der einges. Prot. Lsg.} \left[\text{ml} \right] = F \times \Delta E$$

$$F = \frac{\text{Proteinkonz.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \times \text{Menge d. einges. Prot. Lsg.} \left[\text{ml} \right]}{\Delta E}$$

$$= \frac{100 \text{ mg/ml} \times 0,1 \text{ ml}}{0,250} = 40 \left[\text{mg} \right]$$

Eichkurve zur Proteinbestimmung

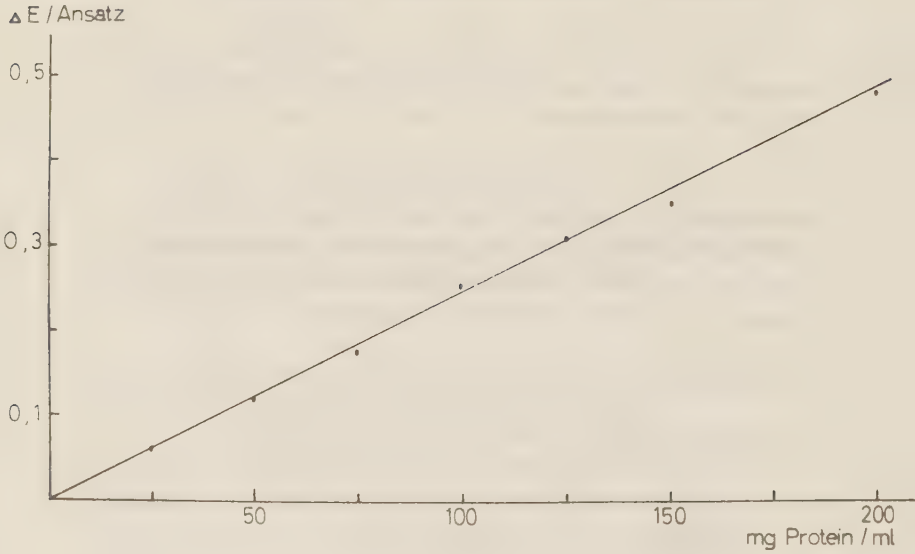


Abb. 1: Die Aufstellung der Eichkurve erfolgte unter Verwendung von Rinder-Serum-Albumin. Ansätze siehe 2.1.4.2

2.1.4.2 Durchführung der Bestimmung

0,1 bis 0,85 ml Enzymlösung wurden mit H₂O bidest. auf 0,85 ml aufgefüllt und nach tropfenweiser Zugabe von 0,15 ml einer 3 m Trichloressigsäure-Lösung mit einem Rührer gemischt und 5 min. bei 1.500xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zentrifugengläser sorgfältig durch Umstülpen auf Filtrierpapier von Flüssigkeitsresten befreit, der Rückstand in 4,9 ml H₂O bidest. suspendiert und 5 ml Biuret-Reagenz zugesetzt. Nach 30 min. erfolgte die Extinktionsbestimmung in einer 1 cm-Küvette bei 546 nm im Eppendorf-Photometer gegen einen Reagenzienleerwert, bestehend aus 5 ml H₂O und 5 ml Biuret-Reagenz.

Durch Umformen der Gleichung bei 2.1.4.1 und Verwendung des berechneten Faktors F können nun die Konzentrationen unbekannter Proteinlösungen bestimmt werden:

$$\text{Proteinkonz.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{F \times \Delta E}{\text{Menge d. einges. Prot. Lsg.} [\text{ml}]}$$

Beispiel:

Die Proben der einzelnen Zellfraktionen bei Tier Nr. 2 ergaben folgende Extinktionen:

Fraktion	Einsatz(ml)	1.Bestimmung	2.Bestimmung
TH	0,05	0.022	0.028
R ₁	0,85	0.021	0.020
R ₂	0,85	0.089	0.087
R ₃	0,2	0.060	0.046
U ₃	0,85	0.086	0.085

Berechnung:

$$\text{Proteinkonz. von TH} = \frac{40}{0,05} \times \frac{0.022 + 0.028}{2} = 20,0 \text{ mg/ml Protein}$$

Die zur Herstellung der Reagenzien verwandten Substanzen waren analysenreine Substanzen der Fa. Merck, Darmstadt.

2.1.5 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Saure-Phosphatase-Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen wurde in Anlehnung an COHN und HIRSCH (3) bestimmt.

Prinzip:

β -Glycero-Phosphat wird in Gegenwart von Saurer-Phosphatase (SP) im sauren pH-Bereich zwischen pH 3 - 5 in Glycerin und anorganisches Phosphat gespalten. Das in einer bestimmten Zeiteinheit enzymatisch freigesetzte anorganische Phosphat wurde nach FISKE und SUBBAROW (15) photometrisch bestimmt.

2.1.5.1 Aufstellung der Phosphat-Eichkurve in Anlehnung an "Photometrische Methoden EPPENDORF - Medizin AV 1630" (16)

Es wurden alle Reagenzien entsprechend der oben angegebenen Literatur verwandt. 0,2 ml Phosphat-Lösung, enthaltend 0,5 bis 6 μ g Phosphor, wurden in ein mit

0,4 ml einer schwefelsauren NH_4 -Molybdat-Lösung¹⁾ beschicktes Mikroreaktionsgefäß pipettiert und anschließend mit 0,4 ml Reduktionslösung²⁾ versetzt. Nach 15 min. erfolgte die Extinktionsmessung gegen einen Reagenzien-Leerwert, der anstelle von Phosphat-Lösung H_2O bidest enthielt.

2.1.5.2 Durchführung der Aktivitätsbestimmung

0,4 ml Puffer-Substrat-Gemisch (100 mM β -Glycero-Phosphat gelöst in 0,2 m Acetat-Puffer pH 4,0) wurden in ein Reaktionsgefäß (Nr. 3010 der Firma Eppendorf) mit 0,1 ml Enzymlösung versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C . Nach 1 Stunde wurde die Reaktion mit 0,1 ml einer 30 %-igen Trichloressigsäure-Lösung gestoppt. Anschließend wurde 10 min. bei 3000 Upm mit einer Ecco-Micro-Zentrifuge zentrifugiert und 0,2 ml des Überstandes in ein bereitgehaltenes und mit 0,4 ml schwefelsaurer NH_4 -Molybdat-Lösung beschicktes Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,4 ml Reduktionslösung wurde durchgemischt und nach 15 min. die Extinktion in einer 1 cm-Mikroküvette im Eppendorf-Photometer bei 576 nm gegen einen Reagenzien-Leerwert gemessen, der an Stelle der 0,1 ml Enzym-Lösung 0,1 ml 0,25 m Saccharose-Lösung enthielt, sonst aber den gleichen Versuchsbedingungen unterlag (Standard-Bedingungen).

Auf eine Korrektur der Reagenzienleerwerte durch Zusatz von 0,1 ml Enzymlösung nach der Inkubation konnte verzichtet werden, da zwischen 0,25 m Saccharose-Lösung und Enzymlösung (in den angewandten Verdün-

¹⁾ 5%ige NH_4 -Molybdat-Lösung in 5n H_2SO_4

²⁾ 25%ige K-Pyrosulfit-Lsg. + 0,5%ige 4-Methylaminophenolsulfat-Lsg. (Photorex) in H_2O

Erstellung der Phosphat-Eichkurve

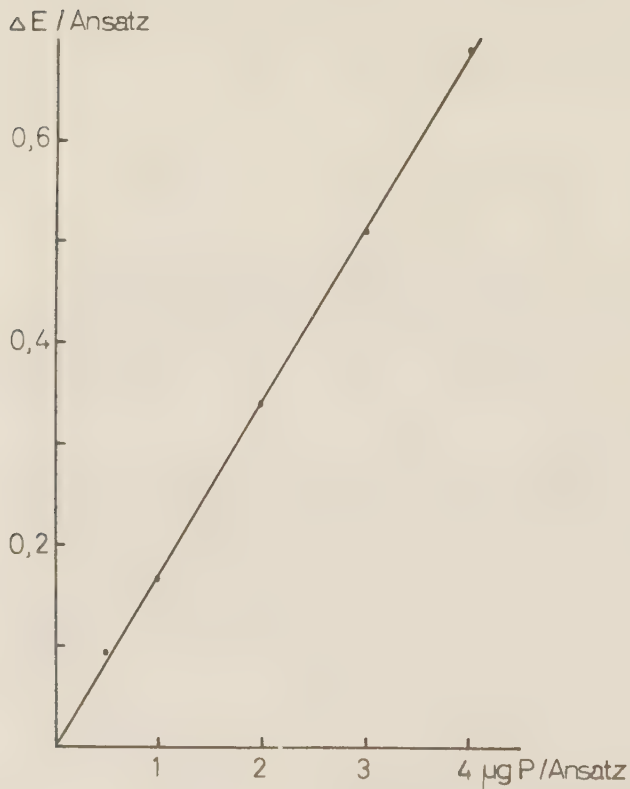


Abb. 2: Die Aufstellung der Phosphat-Eichkurve erfolgte in Anlehnung an "Photometrische Methoden Eppendorf Medizin AV 1630", Ansätze siehe 2.1.5.1

nungen) keine meßbaren Extinktionsunterschiede festzustellen waren.

Zusammensetzung der Inkubationsansätze:

	Reagenzien- leerwert	Enzym-Ansatz
Puffer + Substrat (100 mM β -Glycero-Phosphat = 80 mM Endkonzentration = 40 μ M/Ansatz Lösung in 0,2 m Acetat-Puffer pH 4,0) 1)	0,4 ml	0,4 ml
0,25 m Saccharose-Lösung	0,1 ml	--
Enzym-Lösung	--	0,1 ml
nach 60 min. Stop mit 30 %-iger TCE 2)	0,1 ml	0,1 ml

1) außer bei der Untersuchung der Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion von der Substratkonzentration.

2) außer bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Enzym-Aktivität von der Zeit.

Bei der Prüfung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzym-Konzentration ist unter Standard-Bedingungen gearbeitet worden (vgl. oben).

Berechnung:

Wie aus der Phosphat-Eichkurve (Abb. 2) hervorgeht, entspricht 1 μ g Phosphor einer Extinktion von 0.170. Das Volumen des Inkubations-Ansatzes beträgt nach Abstoppen der Reaktion mit Trichloressigsäure 0,6 ml. Unter Berücksichtigung des Einsatzes von 0,2 ml Reaktionslösung zur Bestimmung des freigesetzten

Phosphors entspricht demnach eine Extinktion von
0.170 3 µg Phosphor.

Es gilt somit:

$$\begin{aligned}\Delta E \text{ 0.170} &= 3 \mu\text{g P/Ansatz} = 96,84 \mu\text{Mol P/Ansatz} \\ &= 96,84 \mu\text{Mol P/l h/ 0,1 ml Enzymlösung} \\ &= 968,4 \mu\text{Mol p/l h/ 1 ml Enzymlösung}\end{aligned}$$

$$F = \frac{968,4}{0.170} = 5696,5$$

$$\Delta E \times 5696,5 \times \text{Verdünnung} = \mu\text{Mol P /h/ ml Enzymlösung}$$

Als 1 Enzymeinheit wird die Enzymmenge definiert,
welche in 1 h 1 µMol Phosphor freisetzt.

Beispiel: Tier Nr. 2

Die Proben der einzelnen Zellfraktionen zeigten fol-
gende Extinktionen (β-Glycero-Ph 80 mM Endkonz. in
0,2 m Acetatpuffer pH 4,0 nach 1 h Inkubation bei
37°C., Messung bei 578 nm):

Fraktion	Verdünnung	1. Bestimmung	2. Bestimmung
TH	1 + 29	0.166	0.165
R ₁	1 + 2	0.046	0.045

Berechnung:

$$\begin{aligned}\text{TH (SP-Enzymaktivität)} &= \frac{0.166 + 0.165}{2} \times 5696,5 \times 30 \\ &= 28.283,12 \mu\text{Mol P/h/ml} \\ &=====\end{aligned}$$

2.1.6 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert der Inkubationslösung

Hier wurde im Gegensatz zu den anderen Inkubations-Ansätzen nicht mit der Enzymlösung, sondern mit Substratlösung gestartet.

Zu 0,35 ml 0,2 m Acetatpuffer wurde 0,1 ml Enzymlösung hinzugefügt und die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml Substratlösung (40 μ M β -Glycero-Phosphat in H_2O gelöst (pro Ansatz) entsprechend 80 mM Endkonzentration) gestartet. Anschließend wurde wie in Abschnitt 2.1.5.2 geschildert verfahren. (Stop mit 30 %-iger TCE usw.).

Da es nicht möglich ist, mit einem Puffer den gesamten pH-Bereich von 1,5 bis 5,6 zu erfassen, wurde in den pH-Bereichen 1,5 bis 4,5 mit 0,2 m Citrat-Puffer, in den pH-Bereichen 3,6 bis 5,6 mit 0,2 m Acetat-Puffer gearbeitet.

2.1.7 Untersuchung des Einflusses von Tartrat, Cu^{++} , Molybdat, Citrat und PCMB auf die Enzymaktivität

Die Enzymkonzentration wurde so eingestellt, daß die gegen einen Reagenzien-Leerwert gemessene Extinktion des ungehemmten Reaktionsgemisches jeweils zwischen 0.200 und 0.250 lag.

Zur Extinktionsmessung wurde der Kontrollansatz ohne Inhibitor auf $E = 0.200$ eingestellt. Die sich erge-

benden Extinktionsdifferenzen der mit Inhibitorlösung versetzten Reaktionsgemische wurden in % der ungehemmten Reaktion angegeben.

Folgende Substanzen wurden auf ihre enzymaktivitätshemmenden Eigenschaften untersucht:

- | | | |
|--|----------------|---|
| 1. di-Na-Tartrat x H ₂ O | in Endkonz.von | 5x10 ⁻² bis 5x10 ⁻⁴ m |
| 2. Cu-II-Sulfat x 5 H ₂ O | | 10 ⁻³ m |
| 3. tri-Na-Citrat x 2 H ₂ O | | 2x10 ⁻² bis 2x10 ⁻⁴ m |
| 4. p-Chlormercuribenzoessäure-Na-Salz (PCMB) | | 10 ⁻⁴ m |
| 5. NH ₄ -heptamolybdat x 4 H ₂ O | | 10 ⁻² bis 10 ⁻⁴ m |

Die Molaritätsangaben stellen jeweils Endkonzentrationen dar. PCMB wurde von der Firma Serva, Heidelberg, die übrigen Substanzen von der Firma Merck, Darmstadt, in p.a.-Qualität bezogen.

Zusammenstellung der Ansätze:

	Reagenzien- Leerwert	Kontrollans. <u>ohne</u> Inhibit.	Kontrollans. <u>mit</u> Inhibit.
Puffer + Substrat (s.Abschnitt 2.1.5.2)	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Inhibitor-Lösung	--	--	0,05
H ₂ O bidest	0,05	0,05	--
Enzym-Lösung	--	0,1	0,1
0,25 m Saccharose-Lsg.	0,1	--	--
nach 60 min.stop mit 30 %-iger TCE	0,1	0,1	0,1
postinkubator. Korrektur mit Inhibitor-Lösung	0,05	0,05	--
postinkubator. Korrektur mit H ₂ O bidest.	--	--	0,05

Der weitere Arbeitsgang entsprach dem in Abschnitt 2.1.5.2 beschriebenen Verfahren.

Berechnung:

Die auf der Photometer-Skala eingestellte Extinktion des ungehemmten Reaktionsgemisches (E_U) auf 0.200 entspricht 100 % der Enzymaktivität. Die gemessenen Extinktionen der gehemmten Reaktionsgemische (E_H) in % der eingestellten Extinktion von 0.200 entspricht der Restaktivität. Die Differenz dieser Werte entspricht der Enzymhemmung:

$$\frac{x \%}{100 \%} = \frac{E_U - E_H}{E_U}$$

$$x \% = \frac{(E_U - E_H) \cdot 100}{E_U} = \text{Enzymhemmung in \%}$$

Beispiel:

Die Proben der gehemmten Reaktionsgemische aus der mikrosomalen Fraktion (R_3) von Tier Nr. 2 ergaben folgende Extinktionen:

	Endkonz.	1. Bestimmung	2. Bestimmung
Citrat	5×10^{-2}	0.200	0.195
Tartrat	2×10^{-2}	0.094	0.096
	2×10^{-3}	0.125	0.121
	2×10^{-4}	0.166	0.162
Cu-II-SO ₄	10^{-3}	0.095	0.095
Molybdat	10^{-2}	0.070	0.070
PCMB	10^{-4}	0.130	0.130

Die Extinktion des ungehemmten Reaktionsgemisches wurde auf 0.200 eingestellt (s.o.).

Enzymhemmung v. Tartrat 2×10^{-2} m

$$= \frac{(0.200 - \frac{0.096 + 0.094}{2}) \times 100}{0.200}$$

$$= \underline{\underline{52,5\%}}$$

2.1.8 Elektrophoretische Trennung der SP-Isoenzyme auf Polyacrylamid-Gel.

2.1.8.1 Vorbereitung der Proben

Die durch Differentialzentrifugation gewonnenen Fraktionen bzw. das ursprüngliche Makrophagen-Homogenat wurde mit 5 % Triton X-100 versetzt und 1 Stunde bei 4°C extrahiert. Unter diesen Bedingungen ist die gesamte, in der betreffenden Fraktion nachweisbare, SP-Aktivität in Lösung gegangen (17). Die auf diese Weise vorbehandelten Proben sind bei 15.000 Upm mit einer Ecco-Mikrozentrifuge in der Kälte 5 min. zentrifugiert worden. Die Überstände sind für die Untersuchungen verwendet worden.

2.1.8.2 Herstellung des Polyacrylamid-Gels und Durchführung der Elektrophorese

Zubereitung des Polyacrylamid-Gels

Es wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung 1: 15 g Acrylamid (Serva)
0,4 g N,N-Methylenbisacrylamid
ad 50 ml mit H₂O

Lösung 2: 0,8 g β -Dimethylaminopropionitril (Fluka)
ad 50 ml mit H₂O

Lösung 3: 0,015 g K-Hexacyanoferrat (Merck)
ad 50 ml mit H₂O

Lösung 4: 0,24 g NH₄-peroxodisulfat (Merck)
ad 50 ml mit H₂O

Die 4 Lösungen wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und in silikonisierten Glasröhrchen 30 min. lang bei 37°C. polymerisiert.

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (18, 19, 20, 21) ist mit einem Shandon-Gerät an einem 7,5 %-igen Gel in Anlehnung an BARKA (22) mit einem 0,05 m Glycin-Puffer pH 8,6 70 min. bei 4°C. und 2 mA/Säule durchgeführt worden.

2.1.8.3 Färbemethode der SP-Bänder auf den Gelsäulen

Das Sichtbarmachen der SP-Bänder auf den Gelsäulen erfolgte nach BURSTONE (23) mit Naphtyl-As-Bi-Phosphat als Substrat und gleichzeitiger Koppelung der an enzymaktiven Stellen freigesetzten Naphtol-As-Bi mit Fast Red Violet LB (Serva Heidelberg) in ei-

nem 0,2 m Acetattpuffer pH 5,2. Das Reaktionsprodukt erscheint an den enzymaktiven Stellen als violetter Farbstoff.

Zusammensetzung des Inkubationsmediums:

5 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat wurden in 0,25 ml Dimethylformamid gelöst und mit 25 ml H₂O bidest, 25 ml Acetattpuffer 0,2 m pH 5,2 und 30 mg Fast Red Violet gemischt und filtriert. Das Gel wurde 30 min. bei 37°C. mit dieser Lösung inkubiert.

2.1.9 Elektrophoretische Trennung und Nachweis von β -Glucuronidase in den einzelnen Zellfraktionen

Alle Bedingungen entsprachen der bereits geschilderten Methode mit dem Unterschied, daß nach erfolgter Elektrophorese zur Sichtbarmachung der enzymatischen Bezirke Naphtol-As-Bi-Phosphat durch Naphtol-As-Bi-Glucuronid ersetzt wurde.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Ausarbeitung der Bestimmung der SP-Aktivität in BCG-induzierten Alveolarmakrophagen

Um die SP-Aktivität zu bestimmen, waren als erstes die optimalen Bedingungen für die Enzymaktivitätsbestimmung in diesem Material zu ermitteln. Es sollten die wichtigsten Kriterien, die die Voraussetzung einer Enzymaktivitätsbestimmung sind, geprüft werden, d.h. es sollte die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration, von der Inkubationszeit, von der Enzymkonzentration und vom pH-Wert bestimmt werden, und zwar sowohl für das Makrophagenhomogenat selbst, als auch für die aus diesem durch Differentialzentrifugation gewonnenen Fraktionen.

3.1.1 Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration

Die Ergebnisse sind in der Abb. 3 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, ist die Enzymaktivität zwischen 70 und 160 mM Substrat für die Bestimmung optimal, so daß alle Bestimmungen in späteren Versuchen bei 80 mM Substratkonzentration durchgeführt wurden.

Auf die Bestimmung der Michaelis-Konstanten mußte verzichtet werden. Von Präparation zu Präparation traten große Schwankungen auf, die wahrscheinlich auf Schwankungen in der Isoenzym-Zusammensetzung der Makrophagenpopulation bei verschiedenen Tieren zurückzuführen sind, wie es später noch geschildert wird.

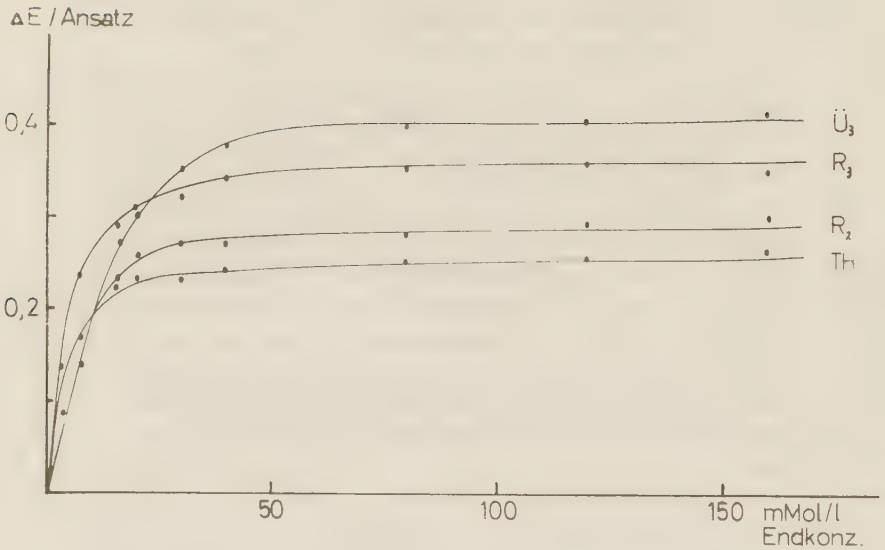


Abb. 3: Abhängigkeit der SP-Aktivität von der Substratkonzentration. Die Bestimmungen wurden mit β -Glycero-Phosphat bei pH 4,0 in 0,2 m Acetat-Puffer nach Standard-Bedingungen durchgeführt. Inkubationszeit 60 min. bei 37°C .
 TH = Makrophagen-Totalhomogenat
 R_2 = Lysosomal-mitochondriale Fraktion
 R_3 = Mikrosomale Fraktion
 Ü_3 = Von Partikeln befreite cytoplasmatische Fraktion
Einzelheiten siehe Methodischer Teil.

3.1.2 Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung von β -Glycero-Phosphat von der Inkubationszeit

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit für die einzelnen Fraktionen ist in Abb. 4 dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist, besteht zwischen Inkubationszeit und Enzymaktivität eine lineare Beziehung bis zu einer Inkubationszeit von 80 min. unter den hier angegebenen Bedingungen. Im folgenden wurde die Inkubationszeit auf 60 min. festgelegt, wobei nur Extinktionen bis 0.500 verwertet wurden bzw. die Enzymkonzentration jeweils so eingestellt wurde, daß nach 60 min. Inkubation Extinktionen unter 0.500 erhalten wurden.

3.1.3 Prüfung der Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung von β -Glycero-Phosphat von der Enzymkonzentration

Wie aus der Abb. 5 ersichtlich ist, besteht eine lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration und enzymatischer Spaltung von β -Glycero-Phosphat unter Standardbedingungen, wenn man Enzymkonzentrationen wählt, die unter den angegebenen Bedingungen zu einer Extinktion unter 0.600 führen.

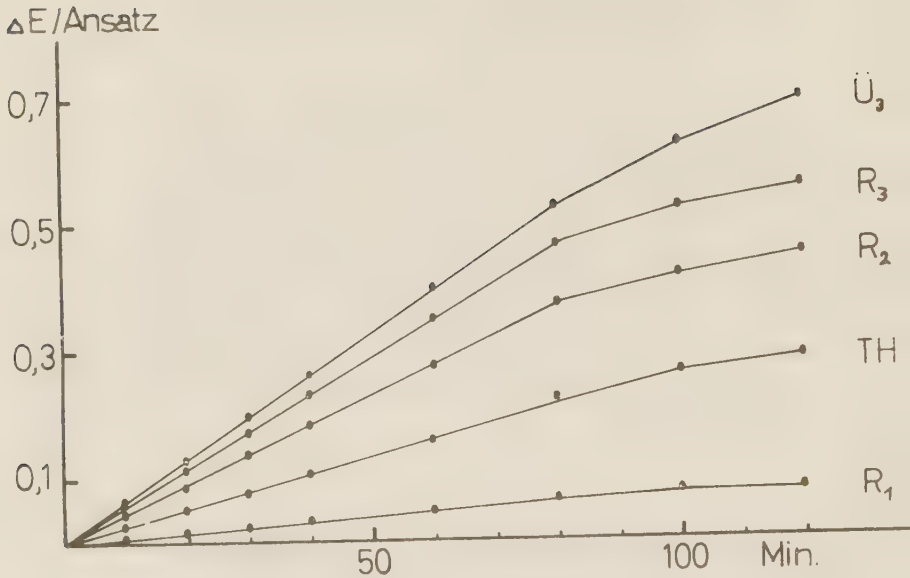


Abb. 4: Abhängigkeit der SP-Aktivität von der Inkubationszeit. Die Bestimmungen erfolgten bei einer Substratendkonzentration von 80 mM β -Glycero-Phosphat in 0,2 m Acetat-Puffer von pH 4,0 bei 37°C.
TH = Makrophagen-Totalhomogenat (0,066 mg Protein/Ansatz)
 R_1 = Nucleäre Fraktion (0,033 mg Protein/Ansatz)
 R_2 = Lysosomal-mitochondriale Fraktion (0,08 mg Protein/Ansatz)
 R_3 = Mikrosomale Fraktion (0,088 mg Protein/Ansatz)
 $\ddot{U}_3$ = Partikelfreie cytoplasmatische Fraktion (0,225 mg Protein/Ansatz)
Einzelheiten siehe Methodischer Teil.

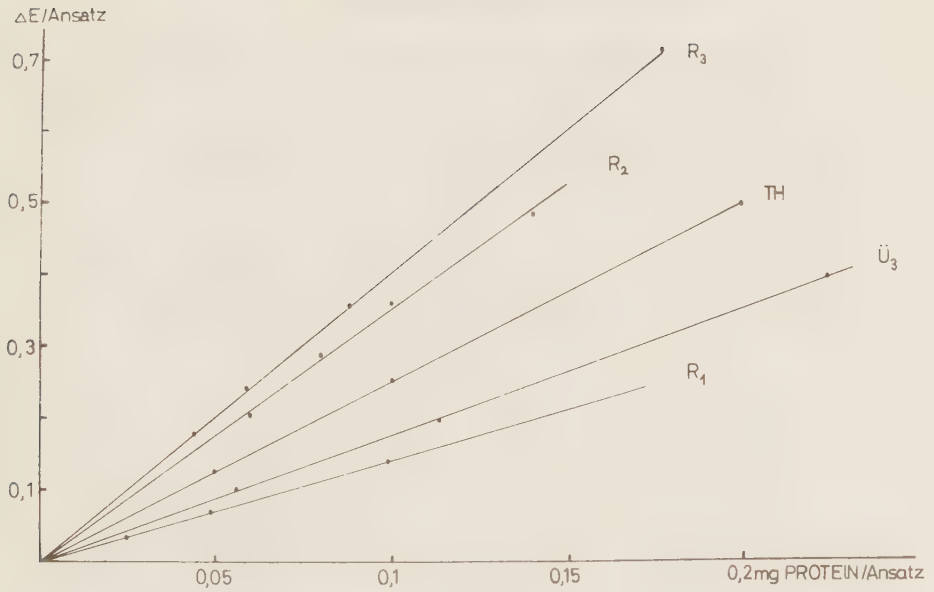


Abb. 5: Abhängigkeit der SP-Aktivität von der Enzymkonzentration. Die Bestimmungen erfolgten bei einer Substratkonzentration von 80 mM 8-Glycero-Phosphat in 0,2 m Acetatpuffer pH 4,0 und einer Inkubationszeit von 60 min. bei 37°C. Extinktionsmessung bei 578 nm. Einzelheiten siehe Methodischer Teil.

3.1.4 Untersuchung der Abhängigkeit der Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen vom pH-Wert des Inkubationsmediums.

Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität der einzelnen Zellfraktionen wurde aus zwei Gründen untersucht:

1. Um die optimalen Bedingungen für die Enzymaktivitätsbestimmung zu erhalten
und
2. um zu prüfen, ob die in den einzelnen Zellkompartimenten anzutreffenden SP-Aktivitäten ähnlich wie Arylamidase (11) auf verschiedene Enzyme mit ähnlicher Spezifität zurückzuführen sind.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, weisen jedoch die SP-Aktivitäten der Zellfraktionen, die durch Differentialzentrifugation gewonnen wurden, keine signifikanten Unterschiede in ihren pH-Optimas auf. In einem breiten pH-Bereich zwischen 3,5 und 4,5 ist die enzymatische Spaltung von β -Glycero-Phosphat optimal bei allen untersuchten Fraktionen und bestätigt die Untersuchungsergebnisse von CHERSI und BERNARDI (25). Die sogenannte nucleare Fraktion konnte nicht untersucht werden, weil das Material für diese Untersuchung wegen der geringfügigen Aktivität nicht ausreichend war. Im folgenden sind alle Untersuchungen bei pH 4,0 durchgeführt worden. (Standard-Bedingungen).

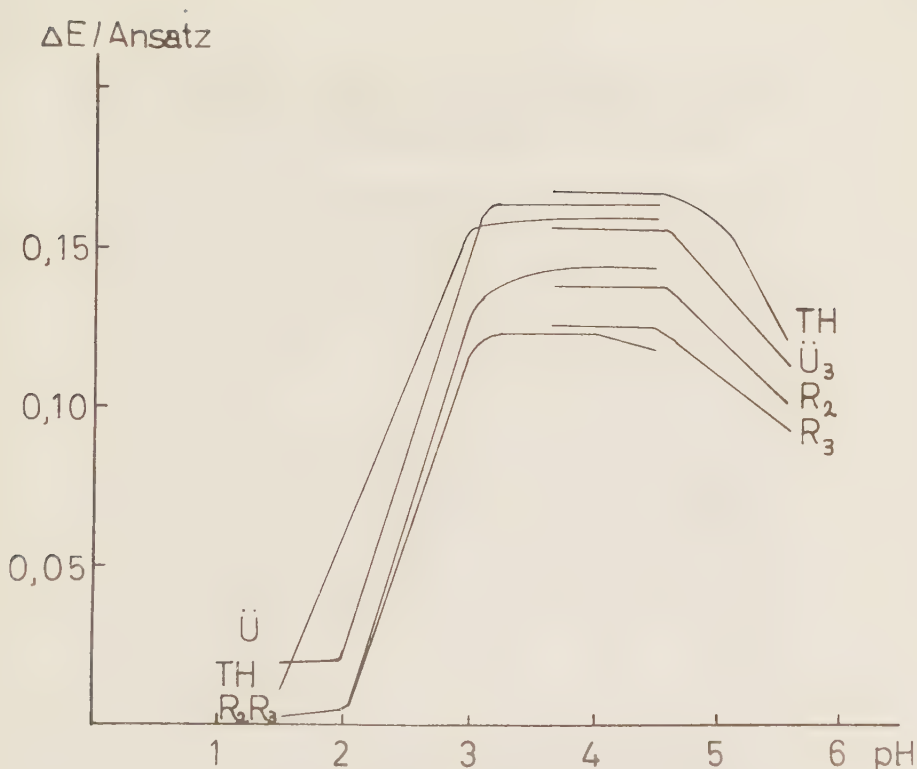


Abb. 6: Abhängigkeit der SP-Aktivität vom pH-Wert des Inkubationsmediums. Die Bestimmungen erfolgten bei einer Substratkonzentration von 80 mM β -Glycero-Phosphat in 0,2 m Citratpuffer (pH 1,5 - 4,5) oder 0,2 m Acetat-Puffer (pH 3,6 - 5,6) bei 37°C. und einer Inkubationszeit von 60 min.

TH = Makrophagen-Totalhomogenat (0,066 mg Protein/Ansatz)

R_2 = Lysosomal-mitochondriale Fraktion (0,4 mg Protein/Ansatz)

R_3 = Mikrosomale Fraktion (0,033 mg Protein/Ansatz)

$\ddot{U}_3$ = Partikelfreie cytoplasmatische Fraktion (0,09 mg Protein/Ansatz)

Einzelheiten siehe Methodischer Teil.

3.2 Bestimmung der SP-Aktivität und die intrazelluläre Verteilung des Enzyms in BCG-induzierten Alveolar-Makrophagen

BCG-induzierte Alveolar-Makrophagen wurden durch Differentialzentrifugation in 4 Fraktionen aufgetrennt (Einzelheiten s. Methodischer Teil). Die Fraktion R_1 repräsentiert die Zellkerne und einige wenige von Präparation zu Präparation etwas schwankenden Anteile an noch nicht vollständig zerstörten Zellen. Wie elektronenoptische Untersuchungen ergaben, enthält die zweite Fraktion R_2 die Lysosomen und Mitochondrien. Die dritte Fraktion R_3 besteht, wie elektronenoptische Aufnahmen zeigen, aus endoplasmatischem Retikulum und wird als mikrosomale Fraktion bezeichnet. Die vierte Fraktion, Fraktion U_3 , wurde nach vorherigem Abzentrifugieren der übrigen Zellpartikel bei 105.000 x g als 105.000xg-Überstand gewonnen.

In Alveolar-Makrophagen, die aus 10 verschiedenen Neuseeländer-Kaninchen gewonnen wurden, ist die Enzymaktivität in Zellhomogenaten und in den betreffenden Zellfraktionen unter Standardbedingungen (s. Methodischer Teil) bestimmt worden.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms sind zusätzlich in den betreffenden Zellfraktionen Proteinbestimmungen mit der Biuret-Methode durchgeführt worden (s. Methodischer Teil).

Tabelle 1 zeigt die intrazelluläre Verteilung von Saurer Phosphatase in Alveolar-Makrophagen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist lediglich 50 % der Aktivität in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion an-

zutreffen. 28 % der Aktivität ist im partikelfreien Überstand nachweisbar, während 15 % in der mikrosomalen Fraktion vorzufinden ist.

Lediglich 2 - 3 % der Aktivität wurde in der Kernfraktion nachgewiesen. Diese geringfügige Aktivität kann mit noch unaufgebrochenen Zellen, die in dieser Fraktion nachweisbar sind und/oder mit Verunreinigungen dieser Fraktion bei der Aufarbeitungsprozedur erklärt werden.

Überraschend ist, daß eine als das lysosomale Leitenzym beschriebene SP nur zu 50 % in der lysosomalen Fraktion anzutreffen ist. Dieser Befund mag jedoch mit der Aufarbeitung der Zellfraktionen in Zusammenhang stehen und womöglich so niedrig ausgefallen sein, weil die Homogenisierung zu Schädigungen von Lysosomen geführt hat und ursprünglich lysosomales Enzym in die U_3 -Fraktion gelangen konnte.

Die in der mikrosomalen Fraktion gefundene hohe SP-Aktivität mit der höchsten spezifischen Aktivität aller untersuchten Fraktionen (s. Tab. 2) läßt sich jedoch mit den bisher bekannten Ergebnissen anderer Autoren oder mit einer unspezifischen Adsorption von löslichen sauren Phosphatasen bzw. Verunreinigung dieser Fraktion bei der Aufarbeitung nicht erklären. COHN und WIENER (5) sowie AXLINE (17), die die Verteilung der SP in BCG-induzierten Alveolarmakrophagen von Kaninchen derselben Rasse untersuchten, haben lediglich eine nucleäre Fraktion, einen durch Differentialzentrifugation bei 15.000xg gewonnenen Rückstand und den 15.000xg-Überstand untersucht, so daß sie eine mikrosomale Fraktion nicht erhalten und deswegen eine mögliche mikrosomale Lokalisation dieses Enzyms

übersehen haben. Sie nahmen an, daß es bei den Enzymaktivitäten, die im 15.000xg-Überstand anzutreffen sind, wohl um aus Lysosomen durch mechanische oder osmotische Schädigung freigesetzte Saure Phosphatase handelt.

Tabelle 1

Verteilung der Enzymaktivitäten der Sauren Phosphatase in den subzellulären Fraktionen
von Alveolarmakrophagen¹⁾

Zellfraktion	Tier Nr.										$\bar{x}$	S
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
R ₁	2,7	1,7	1,7	3,1	2,4	1,9	1,7	2,6	3,0	2,1	2,29	0,54
R ₂	59,4	57,5	30,0	43,0	58,5	51,8	44,5	51,5	58,2	49,8	50,4	9,2
R ₃	14,5	18,7	14,4	14,2	15,1	14,8	14,0	17,1	14,1	15,1	15,1	2,38
Ü ₃	25,4	35,3	28,2	32,5	21,5	29,4	28,5	31,0	24,1	25,5	28,1	4,1
Wiederge- fundene Aktivität	102,0	113,2	74,3	92,8	97,5	97,9	88,7	102,2	99,4	92,5	96	10,2

1) Die Aktivitäten der subzellulären Fraktionen sind in Prozent der wiedergefundenen Aktivität angegeben.

Tabelle 2

Spezifische Aktivität ¹⁾ der Sauren Phosphatase in den subzellulären Fraktionen von
Alveolarmakrophagen

Zellfraktion	Spezifische Aktivität bei pH 4,0										$\bar{x}$	S
	Tier Nr.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Homogenat	1373	1418	1745	1360	1386	1432	1500	1334	1415	1349	1431	120
R ₁	778	828	725	849	816	804	769	780	812	870	803	42
R ₂	1325	1967	1844	1441	1420	1833	1682	1760	1934	1413	1672	232
R ₃	2461	2276	2025	1383	2289	2301	1926	2315	1788	2118	2088	321
Ü ₃	1358	1010	1237	1340	1089	1402	1278	1053	1319	1251	1234	137

1) Die Spezifische Aktivität ist in μmol freigesetztes anorganisches Phosphat pro Stunde und pro mg Protein ausgedrückt.

3.3 Untersuchung des Einflusses von Tartrat, Cu^{++} , Molybdat, PCMB und Citrat auf die SP-Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen

Um die SP-Aktivität in den einzelnen Fraktionen weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluß von Tartrat, Molybdat, Cu^{++} und PCMB auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen untersucht.

PCMB (26) und Tartrat (27) hemmen die Saure Prosta-ta-Phosphataseaktivität. Molybdat, Cu^{++} und Tartrat hemmen nach CHERSI und BERNARDI (25) die aus der Milz angereicherte Saure Phosphatase. Die Untersuchung des Einflusses von Citrat auf die Enzymaktivität wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivitäten durchgeführt.

Wie aus den in der Tabelle Nr. 7 zusammengefaßten Ergebnissen ersichtlich ist, bestehen keine prinzipiellen Unterschiede in der Hemmbarkeit der Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen durch die genannten Substanzen.

PCMB hemmt schwach die Enzymaktivität in allen Fraktionen. Tartrat hemmt konzentrationsabhängig die Enzymaktivität in allen untersuchten Fraktionen, wobei signifikante Unterschiede zwischen der R_3 -Fraktion auf der einen Seite und der R_2 - und U_3 -Fraktion auf der anderen Seite nachweisbar sind. Molybdat hemmt konzentrationsunabhängig alle drei untersuchten Fraktionen, wobei auch hier Unterschiede in der Hemmbarkeit der Enzymaktivität in der R_3 -Fraktion gegenüber der R_2 - und U_3 -Fraktion festzustellen sind. Unterschiede in der Hemmbarkeit der

Enzymaktivität durch Cu^{++} -Ionen zwischen R_3 , R_2 und U_3 konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Cu^{++} hemmte die Enzymaktivität in der R_3 -Fraktion bei derselben Konzentration, wie sie CHERSI und BERNARDI bei der Untersuchung von Milzpräparaten anwandten, in ähnlicher Größenordnung. Citrat hat dagegen keinen Einfluß auf die Enzymaktivität ausgeübt.

Tabelle 3

Untersuchung des Einflusses von d/l-Na-Tartrat (in Endmolarität 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4}) als Inhibitor auf die Enzymaktivität der einzelnen Zellfraktionen.
Die Aktivitäten sind in Prozent der Enzymaktivität ohne d/l-Na-Tartrat ausgedrückt.
Ansätze siehe 2.1.7.

Tier Nr.

Fraktionen

	R ₂		R ₃		t ₃				
	2x10 ⁻²	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²	2x10 ⁻³			
1	78	49	27	50	38	16	78	56	21
2	65	49	18	52,5	36,5	18	63	47	18
3	74,3	57	27	44	32,5	17	66,3	37,8	12,8
4	62	37	13	60	25	12	69	34	16
5	76	50	27	48	35	17	74	50	19
6	79	54	30	51	37	17	78	53	24
7	73	49	24	44	32	20	70	38	12
8	78	45	21	50	35	16	74	48	22
9	70	41	19	45	33	20	65	47	28
10	76	52	30	49	36	16	71	48	24
$\bar{x}$	72	48	23	49	34	17	70,8	46	19
S	5,76	5,95	5,66	4,77	3,73	2,28	5,19	7,07	5,13

Tabelle 4

Untersuchung des Einflusses von NH_4 -Molybdat (in Endmolarität 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) als Inhibitor auf die Enzymaktivität der einzelnen Zellfraktionen. Die Aktivitäten sind in Prozent der Enzymaktivität ohne NH_4 -Molybdat ausgedrückt. Ansätze siehe 2.1.7.

Tier Nr.

	R_2			R_3			U_3		
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1	88	85	84	56	55	55	83	81	85
2	72,5	-	-	65	-	-	70,5	-	-
3	55,8	59	61	44,8	49,5	47	50	58	52
4	47	32	23	50	44	36	58	43	59
5	76	73	78	46	47	46	75	75	72
6	81	84	80	54	56	56	80	84	85
7	72	69	70	48	48	46	70	72	71
8	82	79	80	54	51	48	75	79	81
9	78	76	78	45	47	45	70	65	69
10	80	84	82	56	54	54	78	75	73
$\bar{x}$	73	71	70	51	50	48	71	70	71
S	12,58	16,93	19,21	6,37	4,12	6,23	10,1	12,99	11,17

Tabelle 5

Untersuchung des Einflusses von Cu^{++} (CuSO_4 in Endmolarität 10^{-3}) und p-Chlormercuribenzoessäure-Na-Salz (pCMB in Endmolarität 10^{-4}) als Inhibitoren auf die Enzymaktivität der einzelnen Zellfraktionen.
Die Aktivitäten sind in Prozent der Enzymaktivität ohne d/l-Na-Tartrat ausgedrückt.
Ansätze siehe 2.1.7.

Tier Nr.

Fraktionen

	R_2		R_3		U_3	
	$\text{Cu}^{++} 10^{-3} \text{ m}$	pCMB 10^{-4} m	$\text{Cu}^{++} 10^{-3} \text{ m}$	pCMB 10^{-4} m	$\text{Cu}^{++} 10^{-3} \text{ m}$	pCMB 10^{-4} m
1	72	22	36	22	72	27
2	69	30	57,5	34	67	25
3	55	17,3	42	15,5	44,5	12,5
4	45	15	44	20	51	21
5	68	26	38	25	72	23
6	72	22	38	25	70	25
7	65	19	34	18	68	20
8	61	26	32	24	68	24
9	60	31	30	21	45	20
10	64	23	32	24	66	27
x	63	23	38	22,8	62,3	22
S	8,36	5,22	8,07	5,01	11,01	4,35

Tabelle 6

Untersuchung des Einflusses von Na-Citrat (in Endmolarität 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4}) als Inhibitor auf die Enzymaktivität der einzelnen Zellfraktionen. Die Aktivitäten sind in Prozent der Enzymaktivität ohne Na-Citrat ausgedrückt. Ansätze siehe 2.1.7.

Tier Nr.	Fraktionen									
	R_2					R_3				
	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	$\bar{u}_3$
1	1	0	0	3	1	0	1	0	0	0
2	4	4	2	0	0	0	4	2	0	0
3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	1,2	0,8	0,4	0,6	0,4	0	1,2	0,4	0	0
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 7

Zusammenstellung der Mittelwerte $\bar{x}$ aus den Tabellen 3 bis 6.
Text siehe 3.3.

Fraktion	d/l-Na-Tartrat		NH ₄ -Molybdat		CuSO ₄	pCMB	Na-Citrat	
	2x10 ⁻²	2x10 ⁻³	2x10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	5x10 ⁻²	5x10 ⁻³
R ₂	73	48	43	73	71	70	63	23
R ₃	49	34	17	51	50	48	38	23
U ₃	71	46	19	71	70	71	62	22
							1,2	0,8
							0,6	0,4
							1,2	0,4
							0,4	0
							0,4	0

3.4 Elektrophoretische Auftrennung der Saure-Phosphatase-Isoenzyme in den einzelnen Zellfraktionen auf Polyacrylamid-Gel

AXLINE (17) hat in BCG-induzierten Alveolarmakrophagen fünf Saure-Phosphatase-Isoenzyme elektrophoretisch voneinander trennen und nachweisen können. Er untersuchte sowohl Homogenat-Extrakte von Makrophagen, als auch 3 aus diesen Makrophagen gewonnene Fraktionen: Erstens eine nukleäre Fraktion, zweitens eine lysosomal-mitochondriale Fraktion, welche durch Differentialzentrifugation als 15.000xg-Rückstand angefallen ist, sowie drittens den dabei anfallenden 15.000xg-Überstand.

Im vorangegangenen Kapitel wurden Gründe angeführt, die dafür sprechen, daß SP unter Umständen auch mikrosomal lokalisiert sein könnte. Um zu prüfen, ob die hier in Mikrosomen lokalisierte SP identisch oder verschieden von anderen SP-Isoenzymen ist, wurden Trennversuche mit den interessierenden Fraktionen auf Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Abb. 7 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Wie auch AXLINE unter etwas anderen Versuchsbedingungen (Alaninpuffer pH 4,0 und 4 mA/Trennröhr) fand, sind unter den im Methodischen Teil beschriebenen an BARKA (22) angelehnten Bedingungen 5 Isoenzyme in den mit 5 % Triton X-100 extrahierten Zellhomogenaten (TH) nachweisbar.

Die lysosomal-mitochondriale Fraktion enthält jedoch im Gegensatz zu AXLINE lediglich 4 deutliche Bänder. Das im TH vorhandene Band Nr. 2 fehlt in dieser Fraktion (R_2). Die mikrosomale Fraktion dagegen enthält

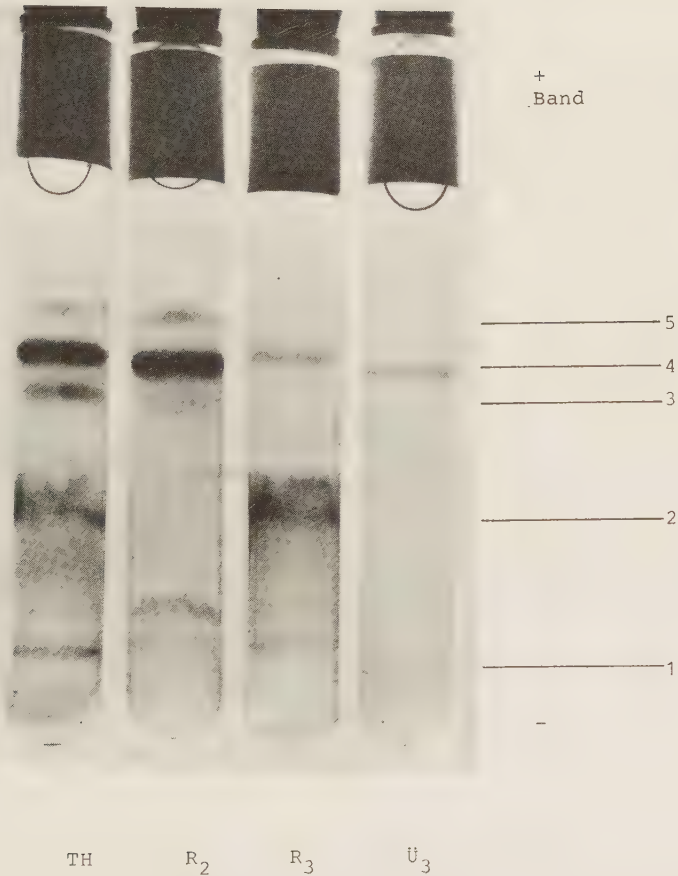


Abb.7: Elektrophoretische Trennung und Nachweis von Saure-Phosphatase-Isoenzymen in den einzelnen Fraktionen.

Die Elektrophorese erfolgte auf 7,5 %-igem Polyacrylamid-Gel 70 min. bei 4°C. in 0,05 m Glycin-Puffer pH 8,6 und 2 mA/Säule. Färbemethode nach BURSTONE siehe 2.1.8.3.

dieses Band 2 neben zwei schwachen Bändern, welche auch in den übrigen Fraktionen enthalten sind.

Die bisher als lysosomales Leitenzym geltende Saure Phosphatase ist demnach nicht nur lysosomal, sondern auch als ein eindeutig unterscheidbares Isoenzym mikrosomal lokalisiert. Auch β -Glucuronidase ist elektronenoptisch mikrosomal lokalisiert nachgewiesen worden (9).

Die als Kontrolle unter den gleichen Bedingungen durchgeführte Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Abb.8) derselben Fraktionen zeigt dagegen keine Unterschiede zwischen mikrosomal und lysosomal lokalisierten β -Glucuronidasen. Außer den in einer Linie liegenden starken Bändern sind keine anderen spezifischen Bänder nachweisbar. Die auf Abb. 8 erscheinenden zusätzlichen Linien und Trübungen erwiesen sich als unspezifisch, denn sie erschienen auch bei Inkubation der Gelsäulen mit einem inkompletten Inkubationsmedium in Abwesenheit des Substrats Naphtol-As-Bi-Glucuronid.

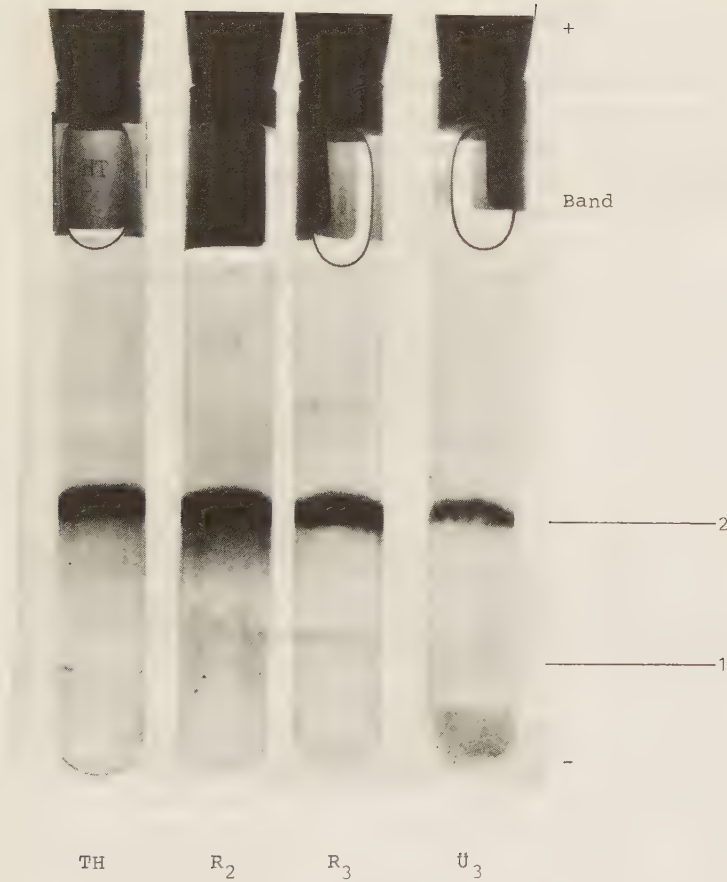


Abb. 8: Elektrophoretische Darstellung der β -Glucuronidase-Isoenzyme in den einzelnen Zellfraktionen. Im Gegensatz zu Abb. 7 ist hier kein Unterschied zwischen der mikrosomalen Fraktion R₃ und den Fraktionen R₂ und U₃ festzustellen. Siehe auch 2.1.9. und 3.4.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die intrazelluläre Verteilung und die spezifische Aktivität der sauren Phosphatase in durch Differentialzentrifugation gewonnenen subzellulären Fraktionen von BCG-induzierten Alveolarmakrophagen von Kaninchen untersucht.

Die höchste spezifische Aktivität weist die mikrosomale Fraktion auf. In dieser Fraktion ist 15 % der Enzymaktivität enthalten. 50 % der Aktivität befindet sich in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion, 24 % der Aktivität ist in dem von Partikeln befreiten Cytoplasma nachweisbar.

Die mikrosomale SP-Aktivität ist stärker durch Tartrat und Molybdat hemmbar als die Enzymaktivität in den übrigen Fraktionen. Citrat hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivität der untersuchten Fraktionen gezeigt. PCMB hemmt geringfügig die Enzymaktivität aller Fraktionen.

Unterschiede in den pH-Optimas zwischen den in den einzelnen Fraktionen nachgewiesenen Enzymaktivitäten konnten nicht festgestellt werden. Das pH-Optimum aller untersuchten Fraktionen liegt zwischen pH 3,5 - 4,5.

Die elektrophoretische Auftrennung der sauren Phosphatase auf polyacrylamid-Gel-Säulen zeigt das Vorhandensein von 5 Isoenzymen. Unter denselben Trennungsbedingungen ließen sich elektrophoretisch keine Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit der in

denselben Zellfraktionen vorhandenen β -Glucuronidase-Aktivitäten nachweisen. Eines der nachgewiesenen Isoenzyme der Sauren Phosphatase kommt nur in der mikrosomalen Fraktion vor. Die bisher als lysosomales Leitenzym bezeichnete saure Phosphatase ist demnach nicht ausschließlich lysosomal lokalisiert. Es konnte damit ein mikrosomal lokalisiertes Isoenzym der sauren Phosphatase nachgewiesen werden.

10. MYRVIK, Q.N.
LEAKE, E.S.
FARISS, B. A Study of Macrophages and Epitheloid-like Cells from Granulomatous BCG-induced Lungs of Rabbits.
J. Immunol. 89, 745 (1962).
11. MYRVIK, Q.N.
LEAKE, E.S.
OSHIMA, S. Studies on Pulmonary Alveolar Macrophages from the normal Rabbit: A technique to procure them in a high state of purity.
J. Immunol. 86, 128 (1961).
12. WEICHSELBAUM,
T.E. Determination of Proteins by Biuret.
Americ. J. Clin. Path. 10,40 (1946).
13. MEDZIHRADSKY Diss. 1961 TH München.
14. Photometrische Methoden Eppendorf
15. FISKE
SUBBAROW The Colorimetric Determination of Phosphorus.
J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
16. Photometrische Methoden Eppendorf Medizin AV 1630.
17. AXLINE, S.G. Isozymes of Acid Phosphatase in Normal and Calmette-Guerin-Bacilles-Induced Rabbit Alveolar Macrophages.
J. of Exp. Med. 128, 1031 (1968).
18. ORNSTEIN, L.
DAVIS, B. Disc Electrophoresis, Parts I and II.
Distillation Products Industries, Rochester, N.Y.
19. ALLAN, J.M.
GOCKERMAN, J. Electrophoretic Separation of Multiple Forms of Particle Associated Acid Phosphatase.
Ann. N.Y., Acad. Sci. 121, 616 (1964).
20. RAYMOND, S.
WEINTRAUB, L. Acrylamide Gel as Supporting Medium for Zone Electrophoresis.
Science 130, 711 (1959).

21. REISFELD, R.A.
LEWIS, V.J.
WILLIAMS, D.E. Biochemistry: Disc Electrophoresis
of Basic Proteins and Peptides on
Polyacrylamide Gels.
Nature 195, 281 (1962).
22. BARKA Studies of Acid Phosphatase.
I. Electrophoretic Separation of
Acid Phosphatase of Rat Liver on
Polyacrylamide Gels.
J. Histochem. Cytochem. 9, 542
(1961).
23. BURSTONE J. Nat. Cancer Institute 21, 523-
539 (1958).
24. WAGNER, B. Lokalisation und Eigenschaften von
Arylamidase-Aktivitäten in Makrophagen.
Diss. 1972 FU Berlin.
25. CHERSI, A. Studies on Acid Hydrolases.
BERNARDI, A. II. Isolation and Properties of
BERNARDI, G. Spleen Acid Phosphomonoesterase.
Biochem. Biophys. Acta 129, 12-22
(1966).
26. TSUBOI, K.K. Acid Phosphatase III. Specific
HUDSON, P.B. Kinetic Properties of Highly
Purified Human Prostatic Phosphomonoesterase.
Arch. Biochem. Biophys. 55, 191
(1955).
27. ABUL-FADL, Properties of the Acid Phosphatases
M.A.M. of Erythrocytes and of the Human
KING, E.J. Prostate Gland.
Biochem. J. 45, 51 (1949).

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein,
unter dessen Leitung auch die vorliegende
Dissertation angefertigt wurde, danke ich für
die Überlassung des Themas.

LEBENS LAUF

Name : Roland Bernhard Gross
Geburtsdatum : 23.12.1938 in
u.-Ort : Stuttgart
Eltern : Bernhard Gross und Hildegard,
geb. Doetterer

Schulen:

1945-1949 Stauffenberg-Grundschule Fellbach
1949-1956 Silcher-Gymnasium Fellbach
1956-1958 Wirtschafts-Gymnasium Stuttgart
und Wirtschaftsabitur
1958 Abitur Oberschulamt Nordwürttemberg

Lehre:

1958-1960 Banklehre bei der Deutschen Bank
Stuttgart
1960 Prüfung an der Industrie- und Handelskammer Stuttgart und Ernennung
zum Bankkaufmann.

Studium:

1960-1963 Studium an der Universität des Saarlandes mit Ablegen von Vorphysikum und Physikum
SS 1963 Universität Kiel
WS 1963/64 Universität Innsbruck
SS 1964 Universität Kiel
WS 64-1966 Freie Universität Berlin
1966 Staatsexamen an der med. Fakultät der Freien Universität Berlin

1967-1968	Medizinal-Assistent im Klinikum Westend und Städt. Krankenhaus Spandau und an der Univ.-Frauenkli- nik Charlottenburg
1969	Approbation als Arzt
1969-1974	Wissenschaftl. Assistent in der Strahlenklinik und Poliklinik der FU im Klinikum Charlottenburg.
1974	Zulassung als Facharzt für Röntgeno- logie und Strahlenheilkunde.
1975	Seit Februar als Facharzt für Röntge- nologie und Strahlenheilkunde in kassenärztlicher Praxis tätig.
1968-1970	Doktorand im immunologischen For- schungslabor des Klinikums Steglitz. In dieser Zeit wurde der experimen- telle Teil der Dissertation durchge- führt.

